

На правах рукописи



Брусницын Даниил Владимирович

**АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ МОНОАМИНОКСИДАЗНЫЕ БИОСЕНСОРЫ
НА ОСНОВЕ ЭЛЕКТРОДОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ
НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫМИ МАТЕРИАЛАМИ, ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИДЕПРЕССАНТОВ**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 2015

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Медянцева Эльвина Павловна

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии ФГАОУ ВПО «Башкирский государственный университет»
Кудашева Флорида Хусаиновна

кандидат химических наук, заместитель начальника отдела Экспертно-криминалистического центра Министерства внутренних дел по Республике Татарстан
Фицев Игорь Михайлович

Ведущая организация: **ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»**

Защита диссертации состоится «3» марта 2016 г. в 10 часов 00 мин. на заседании диссертационного Совета Д 212.081.30 по химическим наукам при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Химический институт им. А.М. Бутлерова, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета. Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВО Казанском (Приволжском) федеральном университете <http://www.kpfu.ru>. Отзывы на автореферат в двух экземплярах просим по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», отдел аттестации научно - педагогических кадров

Автореферат разослан « » декабря 2015 и размещен на сайте ВАК <http://vak.ed.gov.ru>

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук

Якимова Людмила Сергеевна

Актуальность темы. Современные тенденции развития биосенсорных технологий тесно связаны с применением наноструктурированных материалов, что приводит к появлению новых возможностей для совершенствования аналитических устройств, используемых при определении широкого круга биологически активных веществ.

Наиболее часто используемыми наноструктурированными материалами в составе сенсоров являются углеродные наноматериалы и наночастицы (НЧ) металлов. К ним относятся углеродные нанотрубки (одностенные и многостенные – МУНТ), оксид графена (ГО), восстановленный оксид графена (ВГО) и наночастицы золота (НЧАu). Несколько реже для модификации поверхности сенсоров применяют наночастицы серебра (НЧАg). Такое разнообразие наноматериалов объясняется особенностями и возможностями их в плане совершенствования и придания особых свойств поверхности электродов.

Помимо углеродных наноматериалов и НЧ металлов в составе сенсоров используются и другие компоненты, в частности гиперразветвленные полиэфиополиолы (ГРПО). Преимущества их заключаются не только в самой структуре, но и в возможности применять их как стабилизаторы углеродных наноматериалов или НЧ металлов. В то же время ГРПО практически для таких целей не использовались.

Области применения наноматериалов с каждым годом только расширяются. И одно из этих направлений – развитие биосенсорных технологий, связанных с использованием модифицированных наноматериалами сенсоров в медицинских и фармацевтических целях.

В настоящее время контроль качества лекарственных препаратов осуществляют чаще всего используя различные варианты хроматографии. Однако биосенсорные технологии как альтернатива этим методам завоевывают все более прочные позиции. Особенно, если применяют биосенсоры, созданные с применением современных наноструктурированных материалов. Поэтому разработка новых ферментных электродов с использованием таких подходов является **актуальной задачей**.

Среди разных групп лекарственных препаратов особое место занимают антидепрессанты (АД), так как контроль за их использованием является неотъемлемой частью их применения, учитывая, что многие из них относятся к препаратам строгого учета. Определение АД становится возможным благодаря наличию эффекта ингибирования по отношению к ферменту – представителю класса оксидоредуктаз – моноаминоксидазе (МАО). В то же время примеры моноаминоксидазных биосенсоров (МАО-биосенсоров) в настоящее время очень немногочисленны и предназначены для определения биогенных аминов и до последнего времени не применялись для определения АД.

Цель работы – создание амперометрических моноаминоксидазных биосенсоров на основе печатных графитовых электродов, модифицированных наноструктурированными углеродными материалами и наночастицами металлов, для определения антидепрессантов в биологических жидкостях и в лекарственных препаратах.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить способы модификации поверхности печатных графитовых электродов как основы разрабатываемых МАО-биосенсоров различными углеродными наноматериалами и НЧ металлов;

- идентифицировать НЧ на поверхности первичных преобразователей различными методами;

- разработать способы использования карбокси – и аминопроизводных на платформе гиперразветвленного полиэфирополиола Boltorn второго поколения (ГРПО Boltorn H20-COOH и Boltorn H20-NH₂) в составе биосенсоров;

- сопоставить аналитические возможности разработанных амперометрических МАО-биосенсоров, модифицированных различными наноматериалами;

- разработать методики высокочувствительного определения АД, предлагаемыми МАО-биосенсорами в лекарственных препаратах, в моче, в том числе, в присутствии лекарственных веществ разного терапевтического действия.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые:

- разработаны амперометрические МАО-биосенсоры на основе печатных графитовых электродов, модифицированных наноструктурированными материалами различной природы (МУНТ, ВГО, ГО, НЧА_{Au}, Ag, Ni, Cu), предназначенные для определения АД в сложных органических матрицах;

- выявлены модификаторы поверхности печатных графитовых электродов (дисперсии МУНТ, ВГО и НЧА_{Au} и Ag в хитозане, а также НЧ, полученные в режимах циклической вольтамперометрии (ЦВА) – Au и хроноамперометрии (ХА) – Ni, обеспечивающие наилучшие аналитические характеристики разрабатываемых МАО-биосенсоров;

- ГРПО Boltorn использованы как в составе модификатора поверхности электродов (стабилизатор наноразмерного ряда углеродных материалов и НЧ металлов), так и матричного компонента в составе биочувствительного компонента;

- установлены наилучшие сочетания наноструктурированного модификатора (МУНТ в хитозане / НЧА_{Au} в хитозане), стабилизатора (ГРПО Boltorn H20-COOH) и материала матрицы (ГРПО Boltorn H20-NH₂) биочувствительного слоя биосенсоров, обеспечивающие высокочувствительное определение АД и улучшенные аналитические и операционные характеристики;

- показано, что лекарственные вещества с антидепрессивным действием (имипрамин, амитриптилин, тианептин, моклобемид, флуоксетин, фабомотизол, налтрексон, феназепам, гвайфенезин) оказывают ингибирующее действие на каталитическую активность иммобилизованной МАО в составе биосенсоров: в случае биосенсоров, модифицированных МУНТ и МУНТ/НЧА_{Au}, МУНТ/НЧА_{Ag} - двухпараметрически согласованное (смешанное), в случае ВГО и ВГО/НЧNi - двухпараметрически рассогласованное (бесконкурентное) ингибирование;

- разработаны способы определения АД в присутствии лекарственных веществ с различным терапевтическим действием предложенными амперометрическими биосенсорами.

Найденные подходы, заключающиеся в выборе способа модификации поверхности печатных графитовых электродов за счет подбора наноструктурированного материала, стабилизатора размера НЧ и матричного материала биочувствительной части, обеспечивают разработку амперометрических МАО-биосенсоров с заданными аналитическими характеристиками.

Практическая значимость. Предложены новые варианты амперометрических МАО-биосенсоров на основе печатных графитовых электродов, модифицированных наноматериалами (углеродными и НЧ металлов).

Разработаны и апробированы методики высокочувствительного и селективного определения АД в фармацевтических препаратах и биообъектах (урина) при минимальной пробоподготовке, в том числе, в присутствии других лекарственных препаратов, соответствующие требованиям экспрессности и точности.

Модификация поверхности электродов рассматриваемыми наноматериалами в различных сочетаниях обеспечивает более высокочувствительное определение по сравнению с немодифицированными вариантами биосенсоров.

Предложены практические рекомендации по использованию разработанных МАО - биосенсоров для контроля качества лекарственных препаратов строгого учета, позволяющие проводить лекарственный мониторинг при лечении пациентов и внедрение приемов персонализированной медицины.

На защиту выносятся:

- лабораторные модели амперометрических МАО-биосенсоров на основе печатных графитовых электродов, модифицированных углеродными наноматериалами (МУНТ, ГО и ВГО) в растворах хитозана или ГРПО Boltorn H20-COOH и Boltorn H20-NH₂ и НЧ металлов (Au, Ag, Ni, Cu), влияние модификаторов на их аналитические характеристики;
- влияние сочетания НЧА_g, полученных в растворе ГРПО Boltorn H20 и H30, или электрохимически (НЧNi, Cu) с углеродными наноматериалами (МУНТ, ГО и ВГО) в составе биосенсоров на их аналитические возможности;
- условия получения биочувствительной части МАО-биосенсоров с использованием ГРПО Boltorn H20-NH₂ для обеспечения большей величины каталитической активности иммобилизованного фермента и улучшения операционных характеристик;
- кинетические параметры ферментативных реакций с участием иммобилизованной МАО в отсутствие и в присутствии некоторых АД как ингибиторов рассматриваемого фермента;
- методики количественного определения лекарственных веществ с антидепрессивным действием в лекарственных препаратах и биологических жидкостях (урина).

Степень достоверности и апробация работы. Представленные в работе выводы и заключения получены в результате анализа большого объема экспериментального материала с применением современных физико-химических методов. Морфология рабочей поверхности электродов для биосенсоров после модификации (углеродные наноматериалы, НЧ металлов) установлена микроскопическими методами (атомно – силовой и сканирующей

электронной микроскопией – АСМ и СЭМ). Для изучения свойств модифицирующих покрытий на границах раздела фаз электрод/модификатор и электрод/раствор применяли метод спектроскопии электрохимического импеданса (СЭИ), который позволил выявить наилучшие сочетания углеродный наноматериал / НЧ металла.

Результаты исследований были доложены и обсуждены на Всероссийских и с международным участием конференциях: «Материалы и технологии XXI века» (г. Казань, 2012, 2014), «Химия под знаком Сигма: исследования, инновации, технологии» (г. Казань, 2012), «Электрохимические методы анализа - 2012» (г. Уфа, 2012), «Химия и медицина» (г. Уфа, 2013, 2015), «Менделеев 2013 - 2015» (г. Санкт-Петербург, 2013 - 2015), «Второй съезд аналитиков России» (г. Москва, 2013), «Новые химико – фармацевтические технологии» (г. Москва, 2012, 2014), «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (г. Краснодар, 2014), «Бутлеровское наследие – 2015» (г. Казань, 2015), «Химический анализ и медицина» (г. Москва, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 статей, входящих в перечень ВАК, и 17 тезисов докладов.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии на каждом этапе работы: от подготовки и выполнения экспериментальных исследований до обсуждения и оформления полученных результатов. Вся экспериментальная часть работы выполнена непосредственно самим соискателем.

Автор являлся исполнителем гранта Российского фонда фундаментальных исследований (грант 13-03-01101-а).

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 159 страницах машинописного текста, содержит 40 таблиц и 48 рисунков. Работа состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 239 ссылок и приложения.

В первой главе представлены свойства и методы получения углеродных нанотрубок, ГО, ВГО и НЧАи, Ag, Ni, Cu, а также примеры определения биологически активных веществ с использованием биосенсоров на основе электродов, модифицированных углеродными наноматериалами и НЧ металлов.

Во второй главе рассмотрено строение фермента МАО и механизм различного действия АД на каталитическую активность МАО. Представлены методы определения АД.

В третьей главе описаны условия проведения эксперимента, объекты исследования, используемое оборудование, способы расчета кинетических параметров ферментативной реакции.

Четвертая и пятая главы посвящены описанию и обсуждению полученных результатов.

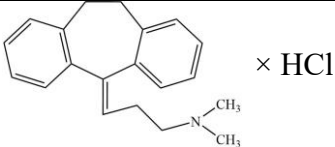
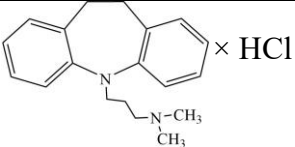
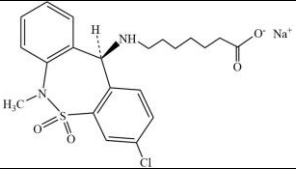
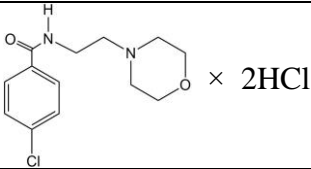
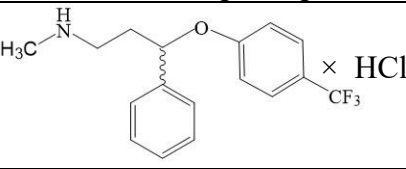
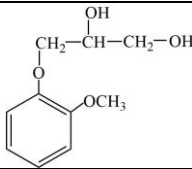
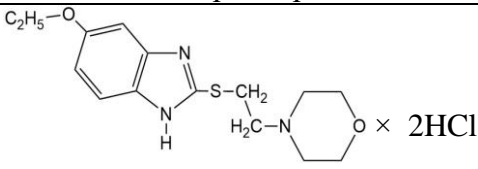
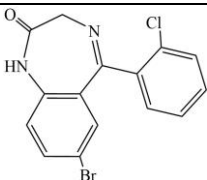
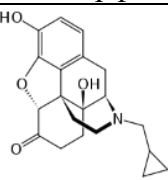
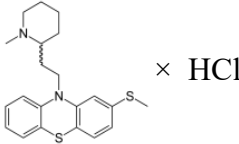
Метод исследования. Все измерения с использованием печатных графитовых электродов проводили с помощью потенциостата/гальваностата «204N» с модулем FRA («Autolab», Netherlands), обеспечивающим возможность работать в различных вариантах вольтамперометрии и СЭИ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В качестве *основы разрабатываемых биосенсоров* служили печатные графитовые электроды конструкции «3 в 1», которые представляли собой систему, состоящую из рабочего, вспомогательного электродов и электрода сравнения на полимерной подложке. Материалом поверхности рабочего электрода, на которой иммобилизуются модификатор и фермент, являлась углеродная паста. Вспомогательный электрод изготовлен также из углеродной пасты «Gwent Electronic Materials» (США). Электрод сравнения – паста Ag/AgCl.

В качестве *объектов анализа* использовали следующие лекарственные вещества: амитриптилин, имипрамин, тианептин, фабомотизол, моклобемид, феназепам, гвайфенезин, налтрексон, тиоридазин, флуоксетин, структурные формулы которых приведены в таблице 1.

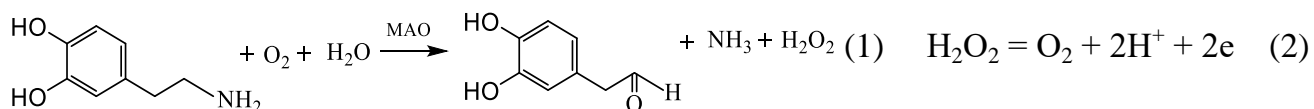
Таблица 1 - Объекты анализа – антидепрессанты и лекарственные вещества с антидепрессивным действием

«Амитриптилин» (амитриптилин) 5-(3-диметиламино-пропилен)- 10,11-дигидроди- бензоциклопентен гидрохлорид	«Мелипрамин» (имипрамин) N-(3-диметиламинопропил)- иминодобензила гидрохлорид	«Коаксил» (тианептин) (RS)-7[(3-хлор-6,11-дигидро-6- метилдобензол[с, f][1,2]тиазепин- 11-ил)амино]гептановой кислоты S,S-диоксид
		
«Аурорикс» (моклобемид) 4-Хлор-N-(2-морфолино-4- этил)бензамида дигидрохлорид	«Флуоксетин» (флуоксетин) (RS)-N-метил-3-фенил-3-[4- (трифторметил)фенокси]про- пан-1-амин гидрохлорид	«Ново-пассит» (гвайфенезин) 2-(метокси-фенокси)пропан-1,2- диол
		
«Афобазол» (фабомотизол) 5-этокси 2[2(морфолино) этилтио]бензимидазол дигидрохлорид	«Феназепам» (феназепам) 7-бром-5-(2-хлорфенил)-1,3- дигидро-1H-1,4- бензодиазепин-2-он	«Налтрексон» (налтрексон) (5α)-17-(Циклопропилметил)-4,5- эпокси-3,14- дигидроксиморфинан-6-он
		
«Сонапакс» (тиоридазин) (±)-2-метилтио-10-[2-(1- метил-2-пиперидил)-этил]-фенотиазина гидрохлорид		

Природа формирования аналитического сигнала амперометрических моноаминоксидазных биосенсоров

Моноаминоксидаза (фермент класса оксидоредуктаз) катализирует реакцию окислительного дезаминирования биогенных аминов (дофамина, серотонина, адреналина и

других) с образованием альдегида, аммиака (или метиламина) и пероксида водорода, который при определенных условиях проявляет электрохимическую активность и способен окисляться. Сочетание этих реакций было использовано в аналитических целях для разработки устройств, позволяющих регистрировать физиологически активные концентрации как биогенных аминов, так и некоторых эффекторов фермента. Именно такой принцип положен в основу функционирования MAO-биосенсоров. Ферментативная реакция окисления субстратов в присутствии MAO-биосенсоров на примере дофамина протекает по схеме 1, а электрохимическое окисление H_2O_2 по схеме 2:



Изучение электрохимического поведения адреналина и дофамина на печатных графитовых электродах показало, что на фоне фосфатного буферного раствора с pH 7.0 на циклических вольтамперограммах наблюдается пик окисления (рисунок 1) субстратов MAO при потенциалах 0.15 В (адреналин) и 0.25 В (дофамин).

В диапазоне потенциалов 0.70 - 0.75 В на вольтамперограммах наблюдается пик, который можно отнести к процессу окисления пероксида водорода (рисунок 1). Количество образующегося пероксида водорода зависит от активности иммобилизованной MAO (ИМАО), в свою очередь, это влияет на величину тока окисления пероксида водорода. Поэтому ток окисления пероксида водорода был выбран в качестве аналитического сигнала для определения эффекторов фермента.

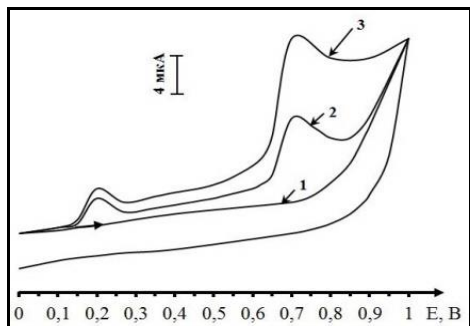


Рисунок 1 - Вольтамперограммы окисления продуктов ферментативного превращения субстрата MAO адреналина (1×10^{-3} моль/л): в отсутствие (3) и в присутствии (2) имипрамина: симипрамина 1×10^{-6} моль/л, фоновый электролит – фосфатный буферный раствор с pH 7.0 (1). Печатный графитовый электрод, модифицированный МУНТ в дисперсии ГРПО Boltorn H20-COOH и НЧА_g, стабилизированные ГРПО Boltorn H30 pH 10.0 (MAO-биосенсор 9)

Модификация поверхности печатных графитовых электродов наноструктурированными материалами

Углеродные наноматериалы. Основой разрабатываемых амперометрических MAO-биосенсоров являются печатные графитовые электроды, поэтому варьировали модификатор, способ его получения в различных растворах, комбинации углеродных наноматериалов с НЧ металлов и количество наноматериала, наносимое на рабочую поверхность электродов методом капельного испарения. Для модификации поверхности электрода использовали дисперсии МУНТ в хитозане и ГРПО Boltorn H20-COOH и Boltorn H20-NH₂, а также дисперсии ВГО и ГО в хитозане.

Установлено, что максимальный аналитический сигнал достигается при концентрации МУНТ, ВГО и ГО 1 мг/мл.

Размер и ориентация углеродных наноматериалов на поверхности печатного

графитового электрода, прежде всего, изменяют профиль поверхности, что отражается на ее шероховатости (S_z , рисунок 2). Изменение шероховатости будет влиять на возможность устойчивой иммобилизации фермента на поверхности модифицированного электрода и опосредованно на аналитический отклик биосенсоров.

Оптимальное количество модификатора по данным АСМ позволило получить хорошо выраженную поверхность (рисунок 2), что создает благоприятные условия для получения впоследствии максимального аналитического отклика биосенсора.

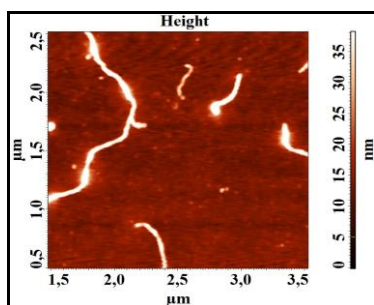


Рисунок 2 – АСМ-изображение в режиме топографии в 2D проекции: поверхность электрода с МУНТ (десять точек по высоте - $S_z = 19 \pm 1$ нм), размер 2×2 мкм

Перепад высот на поверхности печатных графитовых электродов, модифицированных углеродными наноматериалами, позволяет получить профили сечения поверхности на отдельном участке АСМ-изображения.

Преимущественный размер наноматериалов на поверхности электрода позволяют оценить гистограммы распределения, построенные на основании профиля сечения поверхности электрода. Гистограмма распределения углеродных наноматериалов на поверхности электрода показывает, что размер ВГО составляет 20 ± 2 нм, ГО – 75 ± 5 нм, МУНТ – 14 ± 2 нм.

Различия в размерах углеродных наномодификаторов отражаются на свойствах поверхности модифицированных электродов и на аналитических характеристиках разрабатываемых биосенсоров (таблица 2).

Рассмотрение углеродных наноструктурированных модификаторов в составе МАО-биосенсоров показало, что наибольший аналитический сигнал (ток окисления пероксида водорода) наблюдается в случае использования дисперсии МУНТ в хитозане ($I = 6.0 \pm 0.3$ мкА), чуть меньше в случае ВГО в хитозане ($I = 5.0 \pm 0.2$ мкА) и МУНТ в ГРПО Boltorn H20- COOH ($I = 4.0 \pm 0.1$ мкА). При этом наблюдается небольшое смещение потенциала окисления пероксида водорода в менее положительную область ($E = 715 - 735$ мВ, $V = 100$ мВ/с).

Наночастицы металлов. В роли модификаторов поверхности электродов использовали не только наноструктурированные углеродные материалы, но и НЧ металлов (Au, Ag и др.). При этом НЧ металлов можно получать как в растворе и затем наносить их на поверхность используемых электродов, так и непосредственно на поверхности электрода.

Кроме того, в работе исследовали НЧAg, стабилизированные ГРПО Boltorn H20 и H30, которые ранее для этих целей не использовались.

Наличие НЧ металлов, полученных в растворах и используемых в дальнейшем для модификации поверхности электродов, доказывали *спектрофотометрически*. В спектрах поглощения НЧ металлов наблюдаются плазмонные полосы с максимумами, характерными

для сферических НЧАи в K_3Cit при $\lambda = 525$ нм и в хитозане при $\lambda = 550$ нм. Плазмонные полосы поглощения для сферических НЧАг наблюдаются в спектрах K_3Cit при $\lambda = 400$ нм и хитозана при $\lambda = 430$ нм. В спектрах поглощения дисперсии НЧАг в ГРПО Boltorn H20 и H30 наблюдаются максимумы ($\lambda = 427$ и 420 нм), которые соответствуют наличию НЧ. При этом наиболее узкий и высокий пик наблюдается для НЧАг, стабилизированных ГРПО Boltorn H30 pH 10.

Анализ АСМ-изображений в режиме топографии в 2D проекциях (рисунок 3, 4) показывает, что концентрация НЧАи и Аг достаточно высока для появления активных центров на поверхности электродов, что положительно отражается на величине аналитического сигнала.

Практически в одинаковой степени однородной поверхностью обладают электроды с НЧАи и НЧАг, стабилизированные хитозаном. Наиболее однородную поверхность электрода с НЧАг дают НЧ, стабилизированные ГРПО Boltorn H30 pH10 (рисунок 3).

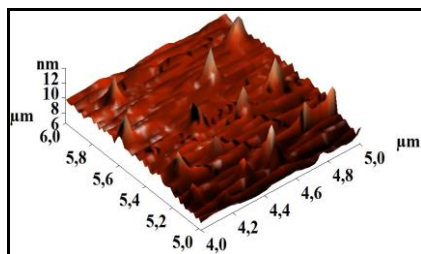


Рисунок 3 – АСМ-изображение в режиме топографии в 3D проекции. Поверхность электрода, модифицированная НЧАг в ГРПО Boltorn H30 pH 10.0, размер 1×1 мкм

Согласно гистограммам распределения средний размер, НЧАг в ГРПО Boltorn H20 – 25 ± 2 нм и в H30 pH 10.0 – 18 ± 1 нм (рисунок 4). Аналогично получены НЧАи и НЧАг в K_3Cit с размерами – 37 ± 2 и 10 ± 1 нм, НЧАи и НЧАг в хитозане – 31 ± 3 и 18 ± 1 нм соответственно, НЧАг в ГРПО Boltorn H20 - 36 ± 2 нм и H30 - 52 ± 4 нм pH 6.0.

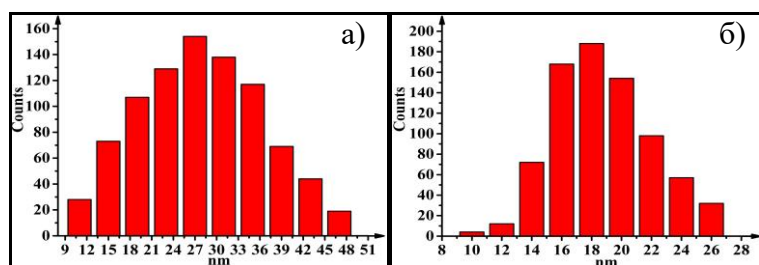


Рисунок 4 - Распределение по размеру НЧАг в ГРПО Boltorn H20 (а) и (б) H30 pH 10.0

С увеличением степени генерации ГРПО Boltorn происходит уменьшение размера НЧ, что влияет на аналитические характеристики МАО-биосенсоров (таблица 2).

Использование *спектроскопии электрохимического импеданса* позволило оценить сопротивление переноса электрона на границах электрод / модификатор и электрод / раствор (рисунок 5).

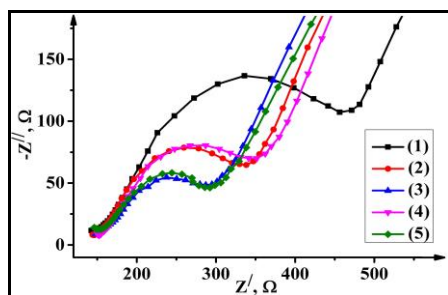


Рисунок 5 - Диаграммы Найквиста: **1** – МУНТ-H20- $COOH$, **2** - МУНТ-H20- $COOH$ /НЧАг-H20 pH 6.0, **3** - МУНТ-H20- $COOH$ /НЧАг-H20 pH 10.0, **4** - МУНТ-H20- $COOH$ /НЧАг-H30 pH 6.0, **5** - МУНТ-H20- $COOH$ /НЧАг-H30 pH 10.0, где Z' и Z'' - реальная и мнимая составляющие импеданса

Наименьшим сопротивлением переноса электрона обладают нанопокртия, обусловленные сочетаниями: МУНТ-ГРПО Boltorn H20-COOH (H20-COOH)/ НЧNi-XA и МУНТ-H20-COOH/НЧАg-ГРПО Boltorn H30 pH 10.0 (H30 pH 10.0, рисунок 5, 6).

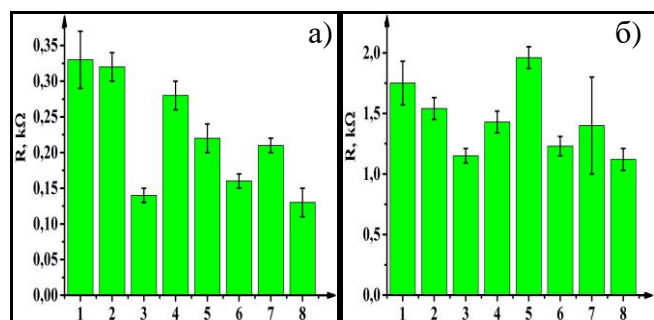


Рисунок 6 – Сопротивление переноса электрона (R) нанопокртия на границе электрод/модификатор (а), электрод/раствор (б): **1** – МУНТ-H20-COOH; **2** – МУНТ-H20-COOH/ НЧNi-ЦВА; **3** – МУНТ-H20-COOH / НЧNi-XA; **4** – МУНТ-H20-COOH/ НЧCu-XA; **5** – МУНТ-H20-COOH/ НЧАg-H20 pH 6.0; **6** – МУНТ-H20-COOH/НЧАg-H20 pH 10.0; **7** – МУНТ-H20-COOH/НЧАg-H30 pH 6.0; **8** – МУНТ-H20-COOH/НЧАg-H30 pH 10.0

Биосенсоры на основе электродов, модифицированных углеродными наноматериалами и наночастицами металлов

Скрининг наноструктурированных материалов разной природы и их сочетаний в качестве модификаторов поверхности печатных графитовых электродов позволил выявить варианты, наиболее выигрышные для разработки МАО-биосенсоров. Наличие наноматериалов на поверхности электродов доказано комплексом методов (АСМ, СЭИ). Выявлены особенности и характеристики каждого вида модификаторов, в том числе, НЧ металлов, используемых в наблюдаемых процессах.

Впервые в качестве матричного компонента биочувствительной части ферментного сенсора использовали ГРПО Boltorn H20-NH₂ (H20-NH₂), что позволило улучшить операционные характеристики биосенсора (рисунок 7).

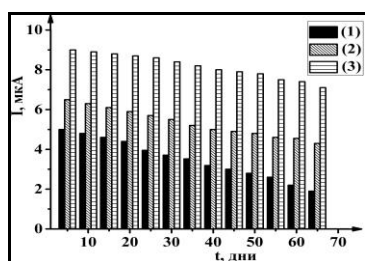


Рисунок 7 - Изменение величины аналитического сигнала (I) от времени хранения (t) биосенсора (1 - биосенсор 3, 2 – биосенсор 9, 3 - биосенсор 10). Концентрация субстрата (дофамина) - 1×10^{-3} моль/л, фосфатный буферный раствор с pH 7.0

Проведенные исследования показали, что наиболее перспективным наноструктурированным материалом, согласно данным СЭИ, является нанокомпозит МУНТ – хитозан/НЧАu-хитозан, который обладает наименьшим значением сопротивления переноса электрона, что в дальнейшем влияет на измеряемый аналитический сигнал.

Полученные результаты позволили разработать следующие биосенсоры, отличающиеся как модификатором поверхности электродов (выделено курсивом), так и матричным компонентом биочувствительной части: **биосенсор 1** - МУНТ-хитозан/ хитозан, **биосенсор 2** - МУНТ- хитозан / НЧАu-ЦВА/ хитозан, **биосенсор 3** - МУНТ-хитозан / НЧАu-хитозан/ H20-NH₂, **биосенсор 4** - МУНТ- хитозан /НЧАg-хитозан/ H20-NH₂, **биосенсор 5** - МУНТ- H20-NH₂/ H20-NH₂, **биосенсор 6** - МУНТ-H20-COOH/НЧАg-H20 pH 6.0 / H20-NH₂, **биосенсор 7** - МУНТ-H20-COOH/НЧАg-H20 pH 10.0/ H20-NH₂, **биосенсор 8** - МУНТ-H20-COOH/НЧАg-H30 pH 6.0/ H20-NH₂, **биосенсор 9** - МУНТ-H20-COOH/НЧАg-H30 pH 10/ H20-NH₂, **биосенсор 10** - МУНТ-H20-COOH/НЧNi-XA/ H20-NH₂, **биосенсор 11** - МУНТ-H20-

COOH/HCSu-XA/ H2O-NH₂, биосенсор 12 – ВГО-хитозан/ H2O-NH₂, биосенсор 13 – ВГО-хитозан/ HCNi-XA/ H2O-NH₂, биосенсор 14 – ВГО-хитозан /HCNi-ЦВА/ H2O-NH₂, биосенсор 15 – ВГО-хитозан /HCSu-XA / H2O-NH₂, биосенсор 16 – ГО-хитозан / хитозан, биосенсор 17 - ГО-хитозан/ H2O-NH₂.

Согласно литературным данным некоторые лекарственные препараты, относящиеся к классу АД, являются эффекторами МАО, что делает возможным проводить их определение с помощью подобных биосенсоров за счет того, что в присутствии АД аналитический сигнал уменьшается. Это указывает на их ингибирующее действие на каталитическую активность фермента. Изучение влияния АД на изменение аналитического сигнала показало, что ток окисления пероксида водорода (0.70 – 0.75 В) линейно зависит от концентрации АД в определенном диапазоне (таблица 2).

На примере определения трициклического АД имипрамина показано, что использование **биосенсоров 2 и 3** позволяет наблюдать линейную зависимость в более широком интервале концентраций, чем для других биосенсоров (1×10^{-4} - 1×10^{-9} моль/л) при более низких значениях нижней границы определяемых концентраций - c_H на уровне $(5-7) \times 10^{-10}$ моль/л (таблица 2).

Таблица 2 - Сопоставление аналитических возможностей различных типов МАО-биосенсоров при определении имипрамина. Субстрат - адреналин, $c_s = 1 \times 10^{-3}$ моль/л ($n=5$; $P=0.95$)

Тип БС	Диапазон определяемых концентраций, моль/л	Уравнение градуировочной зависимости $I^* = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \times (-\lg C)$			c_H , моль/л
		($A \pm \delta$)	($B \pm \delta$)	r	
1	1×10^{-5} - 1×10^{-8}	(16 ± 1)	(-7.1 ± 0.6)	0.9887	9×10^{-10}
2	1×10^{-4} - 1×10^{-9}	(-65 ± 5)	(-15.2 ± 0.9)	0.9957	5×10^{-10}
3		(-94 ± 8)	(-21.7 ± 0.9)	0.9927	7×10^{-10}
4	1×10^{-4} - 1×10^{-8}	(-36 ± 3)	(-15.1 ± 0.8)	0.9965	4×10^{-9}
5		(20 ± 1)	(-2.6 ± 0.2)	0.9894	7×10^{-9}
6		(7.3 ± 0.6)	(-10.2 ± 0.9)	0.9839	8×10^{-9}
7		(5.4 ± 0.5)	(-11.7 ± 0.9)	0.9944	7×10^{-9}
8		(22 ± 2)	(-8.3 ± 0.7)	0.9818	8×10^{-9}
9		(-38 ± 2)	(-14.3 ± 0.8)	0.9997	3×10^{-9}
10		(42 ± 2)	(-7.3 ± 0.6)	0.9921	6×10^{-9}
11		(61 ± 3)	(-2.2 ± 0.1)	0.9832	8×10^{-9}
12		(29 ± 1)	(-2.1 ± 0.1)	0.9822	8×10^{-9}
13		(47 ± 3)	(-4.5 ± 0.3)	0.9928	2×10^{-9}
14		(61 ± 2)	(-2.1 ± 0.1)	0.9906	7×10^{-9}
15		(70 ± 2)	(-1.8 ± 0.1)	0.9975	8×10^{-9}
16		(62 ± 5)	(-3.5 ± 0.3)	0.9970	4×10^{-9}
17		(13 ± 1)	(-4.1 ± 0.3)	0.9972	9×10^{-9}

Аналитические характеристики биосенсоров для определения антидепрессантов

Биосенсоры на основе электродов, модифицированных углеродными нанотрубками. Проведено систематическое изучение аналитических возможностей биосенсоров, разработанных на основе модифицированных МУНТ (дисперсии в хитозане,

ГРПО Boltorn H20-COOH и H20-NH₂), HЧAu, Ag (дисперсии в K₃Cit, хитозане, ГРПО Boltorn H20 и H30 pH 6.0 и 10.0) и HЧAu, Ni, Cu (получены ХА и ЦВА) электродов, для определения АД с использованием различных субстратов MAO (таблица 3).

Таблица 3 - Аналитические возможности разработанных биосенсоров для определения ингибиторов MAO в различных субстрат – ферментных системах (n=5; P=0.95)

Лекарственное вещество / субстрат	Диапазон определяемых концентраций, моль/л	Уравнение градуировочной зависимости			С _н , моль/л
		$I^* = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \times (-\lg C)$			
Биосенсор 3 (модификатор МУНТ-хитозан / НЧАu-хитозан)					
Фабомотизол/серотонин	1×10 ⁻⁴ -1×10 ⁻⁹	(-70±6)	(-18.1±0.8)	0.9986	2×10 ⁻¹⁰
Гвайфенезин/адреналин		(-20±4)	(-12.3±0.9)	0.9983	4×10 ⁻¹⁰
Моклобемид/адреналин		(-70±3)	(-18.4±0.9)	0.9979	6×10 ⁻¹⁰
Биосенсор 4 (модификатор МУНТ-хитозан / НЧАg-хитозан)					
Моклобемид/адреналин	1×10 ⁻⁴ -1×10 ⁻⁸	(9.1±0.7)	(-10.2±0.8)	0.9843	5×10 ⁻⁹
Фабомотизол/адреналин		(-46±2)	(-16.2±0.8)	0.9949	8×10 ⁻⁹
Амитриптилин/дофамин		(-96±8)	(-24.8±0.9)	0.9865	5×10 ⁻⁹
Биосенсор 7 (модификатор МУНТ-Н20-СООН/НЧАg-Н20 рН 10.0)					
Тианептин/адреналин	1×10 ⁻⁴ -1×10 ⁻⁸	(-23±2)	(-14.3±0.8)	0.9921	6×10 ⁻⁹
Имипрамин/дофамин		(-60±5)	(-19.5±0.9)	0.9936	5×10 ⁻⁹
Налтрексон/дофамин		(-43±3)	(-17.4±0.7)	0.9958	4×10 ⁻⁹
Биосенсор 9 (модификатор МУНТ-Н20-СООН/ НЧАg-Н30 рН 10.0)					
Тианептин/адреналин	1×10 ⁻⁴ -1×10 ⁻⁸	(2.1±0.1)	(-12.2±0.9)	0.9984	3×10 ⁻⁹
Имипрамин/дофамин		(-72±3)	(-21.4±0.8)	0.9921	7×10 ⁻⁹
Налтрексон/ дофамин		(8.2±0.6)	(-11.2±0.9)	0.9932	3×10 ⁻⁹
Биосенсор 10 (модификатор МУНТ-Н20-СООН/НЧNi-XA)					
Тианептин/ адреналин	1×10 ⁻⁴ -1×10 ⁻⁸	(32±3)	(-5.2±0.4)	0.9901	4×10 ⁻⁹
Имипрамин/ дофамин		(44±4)	(-4.2±0.3)	0.9970	5×10 ⁻⁹
Феназепам/ дофамин		(22±3)	(-9.7±0.8)	0.9941	3×10 ⁻⁹

$I^* = (I_p/I_s) \times 100\%$, $I_p = (I_s - I_i)$, (I_i) - ток окисления пероксида водорода в присутствии ингибитора, (I_s) - ток окисления пероксида водорода в отсутствие ингибитора.

Правильность полученных результатов проверена способом «введено-найдено» (таблица 4).

Таблица 4 - Результаты определения антидепрессантов разработанными биосенсорами при использовании разных фермент-субстратных систем (n=5; P=0.95)

Антидепрессант	Введено, моль/л	Найдено, моль/л	s_r
Биосенсор 3 (модификатор МУНТ-хитозан/ HЧAu-хитозан)			
Фабомотизол / серотонин	1×10^{-7}	$(0.93 \pm 0.06) \times 10^{-7}$	0.07
	1×10^{-6}	$(0.84 \pm 0.05) \times 10^{-6}$	0.06
Моклобемид/адреналин	1×10^{-7}	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-7}$	0.07
	1×10^{-6}	$(0.89 \pm 0.05) \times 10^{-6}$	0.06
Биосенсор 9 (модификатор МУНТ-H20-COOH/ HЧAg-H30 pH 10.0)			
Имипрамин/ дофамин	1×10^{-7}	$(0.92 \pm 0.05) \times 10^{-7}$	0.05
	1×10^{-6}	$(1.12 \pm 0.06) \times 10^{-6}$	0.05
Налтрексон/дофамин	5×10^{-7}	$(4.9 \pm 0.3) \times 10^{-7}$	0.06
	1×10^{-6}	$(1.15 \pm 0.07) \times 10^{-6}$	0.06

Биосенсоры на основе электродов, модифицированных графеном и наночастицами металлов. В таблице 5 представлены аналитические возможности МАО-биосенсоров на основе электродов, модифицированных ВГО в дисперсии хитозана и НЧAg (раствор ГРПО Boltorn H20 и H30 pH 6.0 и 10.0), НЧNi, Cu (получены ХА и ЦВА).

Для этих биосенсоров область рабочих концентраций изменяется в диапазоне 1×10^{-4} - 1×10^{-8} моль/л, а C_H находится на уровне $(1 - 9) \times 10^{-9}$ моль/л. Наилучшие аналитические характеристики реализуются для следующих субстрат-ингибиторных систем - для биосенсоров 12 (дофамин – флуоксетин), для биосенсоров 13 (адреналин – налтрексон), для биосенсоров 14 и 15 типов (дофамин – тианептин), см. таблицу 5.

Таблица 5 - Аналитические возможности разработанных биосенсоров для определения ингибиторов МАО в различных субстрат – ферментных системах (n=5; P=0.95)

Лекарственное вещество/субстрат	Диапазон определяемых концентраций, моль/л	Уравнение градуировочной зависимости			С _Н , моль/л
		$I^* = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \times (-\lg C)$			
Биосенсор 12 (модификатор ВГО-хитозан)					
Тиоридазин/ дофамин	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-8}$	(56±5)	(-3.2±0.2)	0.9817	6×10^{-9}
Гвайфенезин/ дофамин		(29±2)	(-5.4±0.5)	0.9863	9×10^{-9}
Флуоксетин/ дофамин		(21±2)	(-9.7±0.9)	0.9836	7×10^{-9}
Биосенсор 13 (модификатор ВГО-хитозан /НЧNi-ХА)					
Налтрексон/ адреналин	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-8}$	(25±2)	(-8.5±0.8)	0.9903	6×10^{-9}
Имипрамин/ дофамин		(39±3)	(-3.1±0.3)	0.9901	7×10^{-9}
Налтрексон/ дофамин		(41±4)	(-6.7±0.5)	0.9941	9×10^{-9}
Биосенсор 14 (модификатор ВГО-хитозан /НЧNi-ЦВА)					
Феназепам/ адреналин	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-8}$	(48±3)	(-5.6±0.5)	0.9901	1×10^{-9}
Имипрамин/ дофамин		(25±3)	(-4.5±0.3)	0.9921	4×10^{-9}
Тианептин/ дофамин		(31±3)	(-6.6±0.6)	0.9905	3×10^{-9}
Биосенсор 15 (модификатор ВГО-хитозан /НЧCu-ХА)					
Тианептин/ адреналин	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-8}$	(63±5)	(-2.1±0.1)	0.9958	7×10^{-9}
Имипрамин/ дофамин		(52±2)	(-3.3±0.3)	0.9905	8×10^{-9}
Тианептин/ дофамин		(39±4)	(-5.1±0.5)	0.9921	4×10^{-9}

Биосенсоры на основе электродов, модифицированных оксидом графена. Аналитические возможности МАО-биосенсора 17 на основе электродов, модифицированных ГО, рассчитанные в различных субстрат - ингибиторных системах на примере имипрамина, феназепама и тианептина, представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Аналитические возможности МАО-биосенсора 17 при определении эффекторов МАО в системах субстрат – ингибитор (n=5; P=0.95)

Лекарственное вещество/субстрат	Диапазон определяемых концентраций, моль/л	Уравнение градуировочной зависимости $I^* = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \times (-\lg C)$			C_H , моль/л
		(A±δ)	(B±δ)	r	
Тианептин/ серотонин	1×10^{-4} - 1×10^{-8}	(50±4)	(-5.1±0.4)	0.9992	1×10^{-9}
Имипрамин/ серотонин		(48±4)	(-2.2±0.1)	0.9860	3×10^{-9}
Феназепам/ адреналин		(18±1)	(-5.4±0.5)	0.9928	4×10^{-9}

Линейная зависимость между величиной тока и концентрацией АД наблюдается в области $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-8}$ моль/л, c_H на уровне $(1 - 4) \times 10^{-9}$ моль/л. Как следует из результатов, представленных в таблице 6, лучшие аналитические характеристики для данного биосенсора реализуются для следующей субстрат – ингибиторной системы: серотонин - тианептин.

Кинетические параметры реакции ферментативного превращения субстратов моноаминоксидазы в присутствии антидепрессантов

Согласно значениям кинетических параметров ($K_{m(каж.)}$ и V_{max}) для биосенсора, модифицированного МУНТ-хитозан / НЧАи-хитозан (биосенсор 3) в системе МАО-серотонин для амитриптилина и моклобемида реализуется **двухпараметрически согласованное (смешанное) ингибирование**, характеризующееся затруднением связывания фермента с субстратом в присутствии АД и снижением максимальной скорости реакции (таблица 7). Такой же тип ингибирования наблюдается и для биосенсоров МУНТ - хитозан /НЧАг – хитозан (биосенсор 4), МУНТ-Н20-СООН/НЧАг-Н20 рН 10.0 (биосенсор 7), МУНТ-Н20-СООН/НЧАг-Н30 рН 10.0 (биосенсор 9), МУНТ-Н20-СООН/НЧNi-ХА (биосенсор 10).

Таблица 7 - Кинетические параметры ферментативной реакции в присутствии ИМАО и различных концентраций антидепрессантов. Концентрация субстрата 1×10^{-3} моль/л ($n = 5$; $P = 0.95$)

Лекарственное вещество/субстрат	C, моль/л	K _m (каж.), × 10 ⁻⁴ , моль/л	V _{max} ×10 ⁻⁷ , моль/л×с	Соотношение параметров K _m и V _{max}	K _I , моль ⁻¹
Биосенсор 3					
Амитриптилин/ серотонин	0	(2.1±0.2)	(9.2±0.2)	K _m ' > K _m V' _{max} < V _{max}	(3.86±0.05)×10 ⁻⁷
	10 ⁻⁶	(3.9±0.2)	(2.9±0.1)		
	10 ⁻⁷	(4.7±0.1)	(5.4±0.5)		
Моклобемид/ серотонин	10 ⁻⁶	(4.5±0.1)	(3.4±0.2)		(7.9±0.3)×10 ⁻⁷
	10 ⁻⁷	(2.1±0.1)	(7.5±0.2)		
Биосенсор 13					
Имипрамин/ дофамин	0	(27.6±0.9)	(4.3±0.4)	K _m ' < K _m V' _{max} < V _{max}	(0.25±0.02)×10 ⁻⁷
	10 ⁻⁶	(4.7±0.3)	(1.2±0.1)		
	10 ⁻⁷	(15.2±0.9)	(1.8±0.1)		
Налтрексон/ дофамин	10 ⁻⁶	(5.7±0.5)	(1.1±0.1)		(0.54±0.05)×10 ⁻⁷
	10 ⁻⁷	(6.8±0.6)	(2.2±0.1)		

Здесь K'_m и K_m – кажущиеся константы Михаэлиса в присутствии и в отсутствие ингибиторов фермента соответственно; V'_{max} и V_{max} - максимальная скорость ферментативной реакции в присутствии и в отсутствие ингибиторов фермента.

Значения кинетических параметров для биосенсора, модифицированного ВГО-хитозан/НЧNi-ХА (биосенсор 13) в системах МАО-дофамин и МАО-дофамин для имипрамина и налтрексона показывают, что реализуются **двухпараметрически рассогласованное (бесконкурентное) ингибирование**, характеризующееся усилением связывания фермента с субстратом и снижением максимальной скорости реакции (таблица 7). Такой же тип ингибирования наблюдается и для биосенсора 15 (модификация ВГО-хитозан/НЧCu-ХА).

Определение антидепрессантов в лекарственных препаратах и биологических жидкостях

Определение лекарственных веществ. Согласно полученным результатам, представленным в таблице 8, определение соответствующих лекарственных веществ в лекарственных препаратах: «Аурорикс», «Ново - Пассит», «Амитриптилин», «Афобазол», «Мелипрамин», «Коаксил», «Феназепам», «Налтрексон», «Флуоксетин» с помощью разработанных MAO-биосенсоров.

Таблица 8 - Результаты определения лекарственного вещества в лекарственных препаратах биосенсорами разных типов (n=5, P=0.95)

Лекарственный препарат	Содержание, мг	Найдено, мг	S _г
Биосенсор 3 (модификатор МУНТ-хитозан/ НЧАи-хитозан)			
«Аурорикс»	(15±1)	(15.8±0.9)	0.06
«Ново - Пассит»	(200±15)	(200±12)	0.07
«Коаксил»	(12.5±0.5)	(12.3±0.7)	0.06
«Афобазол»	(10±1)	(10.3±0.7)	0.07
Биосенсор 4 (модификатор МУНТ-хитозан/ НЧАg-хитозан)			
«Амитриптилин»	(25±1)	(25.7±0.9)	0.04
«Афобазол»	(10±1)	(10.2±0.7)	0.07
Биосенсор 9 (модификатор МУНТ-Н20-СООН/ НЧАg-Н30 pH 10.0)			
«Мелипрамин»	(25±1)	(25.1±0.9)	0.04
«Феназепам»	(2.5±0.1)	(2.8±0.2)	0.08
«Налтрексон»	(50±2)	(51±2)	0.04
Биосенсор 10 (модификатор МУНТ-Н20-СООН/ НЧNi-XA)			
«Феназепам»	(2.5±0.1)	(2.4±0.2)	0.08
«Коаксил»	(12.5±0.8)	(12.7±0.6)	0.05
Биосенсор 13 (модификатор ВГО-хитозан /НЧNi-XA)			
«Амитриптилин»	(25±1)	(25.4±0.8)	0.03
«Мелипрамин»	(25±1)	(25.6±0.9)	0.04
«Флуоксетин»	(20±2)	(21.1±0.9)	0.05
«Сонапакс»	(10±1)	(10.3±0.7)	0.07

Оценка мешающего влияния лекарственных препаратов на аналитический сигнал моноаминоксидазных биосенсоров. Была оценена возможность определения АД в присутствии лекарственных препаратов различного терапевтического действия, в частности, «Энапа» «Тетрациклина», «Веро-ципрофлоксацина», «Найза» в соотношении 1:100 с помощью MAO - биосенсоров 10 и 13 (таблица 9).

В таблице 10 приведены результаты, полученные разными способами в том числе с помощью разработанного MAO-биосенсора 3 (модификатор МУНТ-хитозан/ НЧАи-хитозан). Полученные значения равноточны ($F_{расч.} < F_{табл.}$), а систематическая погрешность незначима ($t_{расч.} < t_{табл.}$).

Результаты спектрофотометрического определения амитриптилина в области концентраций 3×10^{-3} - 5×10^{-5} моль/л с помощью разработанного биосенсора 3 показывают, что расхождения между средними значениями определения разными методами незначимы (таблица 10).

Таблица 9 - Результаты определения антидепрессантов разными биосенсорами в присутствии других лекарственных препаратов при соотношении компонентов 1:100, субстрат адреналин с концентрацией 1×10^{-3} моль/л ($n = 5$; $P = 0.95$)

Тип биосенсора	Определяемый антидепрессант и сопутствующий лекарственный препарат	Введено, моль/л	Найдено, моль/л	S_r
10	«Амитриптилин» «Энап»	1×10^{-7} 1×10^{-5}	$(0.91 \pm 0.06) \times 10^{-7}$	0.07
	«Амитриптилин» «Тетрациклин»		$(1.11 \pm 0.06) \times 10^{-7}$	0.06
13	«Мелипрамин» «Веро-ципрофлоксацин»		$(0.93 \pm 0.06) \times 10^{-7}$	0.06
	«Мелипрамин» «Найз»		$(1.12 \pm 0.07) \times 10^{-7}$	0.07

Таблица 10 - Определение содержания амитриптилина в лекарственном препарате «Амитриптилин» титриметрически, спектрофотометрически и с помощью МАО-биосенсора 3, субстрат – дофамин с концентрацией 1×10^{-3} моль/л ($n = 5$; $P = 0.95$), $t_{\text{табл}} = 2.78$, $F_{\text{табл}} = 6.39$

Метод	Найдено, мг/мл		$t_{\text{расч}}$	$F_{\text{расч.}}$
	$(\bar{x} \pm \delta) \times 10^{-2}$ мг/мл	S_r		
Титрование	(3.47 ± 0.01)	0.0035	1.15	1.43
МАО – биосенсор 3	(3.6 ± 0.2)	0.0524		
Спектрофотометрия (λ 244 нм)	(3.27 ± 0.1)	0.0327	1.25	1.48

Определение антидепрессантов L-цистеиндесульфгидразным биосенсором.

Принцип действия L-цистеиндесульфгидразного биосенсора (ЦДГ-биосенсора) основан на других реакциях и закономерностях, чем для МАО-биосенсоров. Ингибирующее действие на фермент оценивали по количеству цистеина (субстрата), не вступившего в реакцию с ЦДГ. МАО-биосенсоры позволяют оценить количество ингибитора по количеству выделившегося в ходе ферментативной реакции продукта (H_2O_2). Амитриптилин и некоторые другие АД обладают ингибирующим действием по отношению к ЦДГ, поэтому ЦДГ-биосенсоры на основе печатных графитовых электродов могут быть использованы для оценки правильности результатов, получаемых с помощью МАО-биосенсоров (таблица 11).

Таблица 11 – Аналитические возможности определения амитриптилина с помощью биосенсоров, концентрация дофамина и цистеина 1×10^{-3} моль/л ($n=5$, $P=0.95$).

Тип биосенсора	Диапазон определяемых концентраций, моль/л	Уравнение градуировочной зависимости $I^* = (A \pm \delta) + (B \pm \delta) \times (-\lg C)$			S_n , моль/л
		$(A \pm \delta)$	$(B \pm \delta)$	r	
МАО-биосенсор 2	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-9}$	(-33 ± 2)	(-13.5 ± 0.9)	0.9984	6×10^{-10}
ЦДГ-биосенсор без модификатора	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-8}$	(1.05 ± 0.02)	(-2.34 ± 0.05)	0.9882	9×10^{-9}
ЦДГ-биосенсор МУНТ	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-8}$	(1.12 ± 0.04)	(-5.23 ± 0.06)	0.9958	7×10^{-9}
ЦДГ-биосенсор МУНТ/НЧАu		(2.48 ± 0.05)	(-11.3 ± 0.6)	0.9974	5×10^{-9}

$I^* = (I_p / I_s) \times 100\%$, $I_p = (I_i - I_s)$, (I_i) - ток окисления цистеина с ингибитором, (I_s) - ток окисления цистеина в отсутствие ингибитора.

Сопоставление аналитических возможностей разработанных МАО-биосенсора 2 (модификатор МУНТ-хитозан/ НЧАи-ЦВА) и ЦДГ-биосенсора при определении амитриптилина представлены в таблице 11.

Определение антидепрессантов в моче. Поскольку аналитические характеристики, приведенные в таблице 12, в рамках применения одного и того же МАО-биосенсора в растворах урины, модельного раствора урины и буферного раствора незначительно отличаются друг от друга, то можно использовать любой из градуировочных графиков для определения остаточных количеств лекарственных препаратов, относящихся к классу АД, в моче при условии разбавления исходного раствора в 50 раз.

Таблица 12 - Аналитические возможности определения имипрамина с помощью МАО-биосенсоров, субстрат 1×10^{-3} моль/л адреналина ($n=5$, $P=0.95$)

Исследуемый раствор	Область рабочих концентраций моль/л	Уравнение градуировочной зависимости			С _Н , моль/л
		I* = (A±δ) + (B±δ)×(-lg C)			
		(A±δ)	(B±δ)	r	
МАО-биосенсор 3 (модификатор МУНТ-хитозан/ НЧАu-хитозан)					
Урина	1×10 ⁻⁴ -1×10 ⁻⁹	(-69±6)	(-16.4±0.9)	0.9825	8×10 ⁻¹⁰
Модельный раствор урины		(-67±6)	(-15.9±0.8)	0.9864	7×10 ⁻¹⁰
Фосфатный буферный раствор		(-65±5)	(-15.2±0.7)	0.9957	5×10 ⁻¹⁰
МАО-биосенсор 10 (модификатор МУНТ-Н20-СООН/НЧNi-XA)					
Урина	1×10 ⁻⁴ -1×10 ⁻⁸	(41±4)	(-8.3±0.8)	0.9842	8×10 ⁻⁹
Модельный раствор урины		(43±3)	(-7.9±0.7)	0.9881	7×10 ⁻⁹
Фосфатный буферный раствор		(42±2)	(-7.3±0.6)	0.9921	6×10 ⁻⁹

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассматриваемые варианты модификации электродов впервые были применены к МАО-биосенсорам для определения веществ с антидепрессивным действием. Установлено, что улучшение аналитических характеристик биосенсоров в результате модификации поверхности электродов наноструктурированными материалами проявляется по-разному: увеличением интервала рабочих концентраций на 1 - 1.5 порядка, коэффициента корреляции между зависимостью величины аналитического сигнала и концентрацией вещества, коэффициента чувствительности и снижением C_H до уровня $n \times 10^{-9(-10)}$ моль/л.

Выявлены МАО-биосенсоры с высокими аналитическими и метрологическими характеристиками для определения лекарственных веществ с антидепрессивным действием: биосенсоры 3, 4, 7, 9, 10, 13. Селективность определения АД связана, с одной стороны, со специфичностью действия ИМАО в составе биосенсоров, с другой стороны, с соответствующей пробоподготовкой образцов. Согласно полученным значениям C_H при определении фамотизола (активный компонент «Афобазола») МАО-биосенсорами наилучшим модификатором является дисперсия МУНТ-хитозан / НЧАи-хитозан.

Следует отметить, что многие АД относятся к лекарственным препаратам строгого учета и контроль за их использованием и применением в терапевтических целях имеет особое значение, в том числе, учитывая необходимость проведения высокочувствительных и экспрессных медико-криминалистических экспертиз. Результаты исследования могут быть

полезны при последующих разработках как моноаминоксидазных, так и биосенсоров, основанных на других фермент-субстратных системах для решения широкого круга электроаналитических задач.

На основе полученных результатов сформулированы следующие выводы:

1. Предложены новые амперометрические моноаминоксидазные биосенсоры для определения лекарственных веществ с антидепрессивным действием на основе печатных графитовых электродов, модифицированных дисперсиями графена, углеродных нанотрубок, наночастицами Au и Ag в хитозане, а также электрохимически генерированными наночастицами Au, Ni и Cu, что обеспечило получение максимального аналитического сигнала и увеличение коэффициента чувствительности. Согласно методу атомно – силовой микроскопии размер наночастиц Au и Ag в хитозане составляет соответственно 31 и 18 нм. Нанокompозиты на основе углеродных нанотрубок и наночастиц Au и Ag в хитозане, согласно спектроскопии электрохимического импеданса, обладают наименьшим сопротивлением переносу электрона, что приводит к увеличению аналитического сигнала моноаминоксидазных биосенсоров.

2. В качестве модификаторов печатных графитовых электродов получены дисперсии углеродных нанотрубок в растворах карбокси- и аминопроизводных на платформе гиперразветвленного полиэфирополиола Boltorn H20. Впервые использованы аминопроизводные на платформе гиперразветвленного полиэфирополиола Boltorn H20 как в составе модификаторов поверхности электродов, так и матричного материала биочувствительной части моноаминоксидазных биосенсоров, которые обеспечивают более прочное связывание с поверхностью электродов наноструктурированных модификаторов и биочувствительной части биосенсоров, что приводит к улучшению их операционных характеристик.

3. Обнаружено, что уменьшение размера наночастиц Ag (согласно атомно – силовой микроскопии размер изменяется от 52 до 18 нм), стабилизированных гиперразветвленными полиэфирополиолами Boltorn H20 и H30, как модификаторов поверхности электродов, приводит к улучшению аналитических характеристик биосенсоров. Использование моноаминоксидазных биосенсоров на основе модифицированных электродов позволяет снизить нижнюю границу определяемых концентраций до $(5-10) \times 10^{-9}$ моль/л.

4. В результате сопоставления аналитических возможностей разработанных биосенсоров установлено, что наилучшими аналитическими характеристиками обладают биосенсоры на основе электродов, модифицированных дисперсиями углеродных нанотрубок, графена и наночастиц Au и Ag в хитозане, а также наночастиц, полученных методами циклической вольтамперометрии (Au) и хроноамперометрии (Ni).

5. Кинетические параметры реакций ферментативного превращения субстратов в присутствии моноаминоксидазных биосенсоров и антидепрессантов в определенных концентрационных интервалах соответствуют процессам двухпараметрически согласованного ингибирования (модификатор углеродные нанотрубки/ наночастицы

металлов) и двухпараметрически рассогласованного ингибирования (модификатор графен/ наночастицы металлов).

6. Разработаны методики определения лекарственных веществ в препаратах «Амитриптилин», «Мелипрамин», «Аурорикс», «Коаксил», «Афобазол», «Ново - Пассит», «Феназепам», «Налтрексон», «Флуоксетин» с помощью предложенных биосенсоров. Показана возможность определения веществ, обладающих антидепрессивным действием, в присутствии антибиотиков и нестероидных противовоспалительных препаратов, а также в моче в широком концентрационном диапазоне 1×10^{-4} - 1×10^{-9} моль/л.

Основное содержание диссертации изложено в публикациях:

Статьи

1. **Брусницын, Д.В.** Новые амперометрические моноаминоксидазные биосенсоры на основе модифицированных многослойными и однослойными углеродными нанотрубками электродов для определения антидепрессантов / **Д.В. Брусницын, Э.П. Медянцева, Р.М. Варламова, М.А. Байбатарова** // Вестник Казанского технологического университета. - 2012. - Т. 15, №13. - С. 125 - 128.

2. Медянцева, Э.П. Амперометрические L - цистеиндесульфгидразные биосенсоры на основе модифицированных графитовых печатных электродов для определения антидепрессантов / Э.П. Медянцева, **Д.В. Брусницын**, Р.М. Варламова, М.А. Байбатарова, Г.К. Будников // Ученые записки Казанского университета. Естественные науки. – 2013. - Т. 155. – Кн. 2. – С. 51 – 65.

3. **Брусницын, Д.В.** Амперометрическое определение антидепрессантов моноаминоксидазными биосенсорами на основе углеродных нанотрубок и наночастиц серебра как химических модификаторов / **Д.В. Брусницын, Э.П. Медянцева, Р.М. Варламова, А.А. Максимов, А.Н. Фаттахова, Г.К. Будников** // Ученые записки Казанского университета. Естественные науки. – 2014. - Т. 156. – Кн. 2. – С. 37 – 50.

4. Медянцева, Э.П. Определение антидепрессантов амперометрическими моноаминоксидазными биосенсорами на основе графитовых печатных электродов, модифицированных многослойными углеродными нанотрубками / Э.П. Медянцева, **Д.В. Брусницын**, Р.М. Варламова, М.А. Байбатарова, Г.К. Будников, А.Н. Фаттахова // Химико-фармацевтический журнал - 2014. - Т.48, №7. – С. 52 - 56.

5. Медянцева, Э.П. Определение лекарственных препаратов строгого учета амперометрическими моноаминоксидазными биосенсорами / Э.П. Медянцева, **Д.В. Брусницын**, Р.М. Варламова, М.А. Бешевец, Г.К. Будников, А.Н. Фаттахова, С.С. Бабкина // Бутлеровские сообщения. - 2014. - Т.37, №3. – С. 105 - 112.

6. Медянцева, Э.П. Амперометрические моноаминоксидазные биосенсоры на основе графитовых электродов и оксида графена как модификатора поверхности для определения некоторых антидепрессантов / Э.П. Медянцева, **Д.В. Брусницын**, Р.М. Варламова, Р.Р. Ситдикова, А.Н. Галявина, Г.К. Будников // Аналитика и контроль. – 2014. - Т. 18, № 4. – С. 442 – 450.

7. **Брусницын, Д.В.** Углеродные наноматериалы как модификаторы поверхности

электродов при разработке амперометрических моноаминоксидазных биосенсоров / **Д.В. Брусницын**, Э.П. Медянцева, Р.М. Варламова, Р.Р. Ситдикова, А.Н. Фаттахова, О.А. Коновалова, Г.К. Будников // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. - 2015. - Т. 81, №6. - С. 21 – 27.

8. Медянцева, Э.П. Возможности амперометрических моноаминоксидазных биосенсоров на основе модифицированных многостенными углеродными нанотрубками графитовых печатных электродов для определения некоторых антидепрессантов / Э.П. Медянцева, **Д.В. Брусницын**, Р.М. Варламова, М.А. Бешевец, Г.К. Будников, А.Н. Фаттахова // Журнал аналитической химии. - 2015. - Т. 70, № 5. - С. 470 – 475.

9. Медянцева, Э.П. Влияние наноструктурированных материалов как модификаторов поверхности электродов на аналитические возможности амперометрических биосенсоров / Э.П. Медянцева, **Д.В. Брусницын**, Р.М. Варламова, А.А. Максимов, А.Н. Фаттахова, О.А. Коновалова, Г.К. Будников // Журнал прикладной химии.- 2015. – Т. 88, № 1. - С. 45 – 54.

10. Медянцева, Э.П. Моноаминоксидазные биосенсоры на основе наночастиц серебра и оксида графена для определения лекарственных веществ с антидепрессивным действием / Э.П. Медянцева, **Д.В. Брусницын**, Р. М. Варламова, А.А. Максимов, О.А. Коновалова, Г.К. Будников // Бутлеровские сообщения. - 2015. - Т.41, №3. – С. 36 – 43.

Тезисы докладов

1. Медянцева, Э.П. Аналитические возможности новых амперометрических биосенсоров в определении лекарственных препаратов разного терапевтического действия / Э.П. Медянцева, **Д.В. Брусницын**, Л.М. Сафарова, Р.М. Варламова, Е.Ю. Тарасова, Г.Р. Сахапова, С.С. Бабкина, Г.К. Будников // Сборник материалов конференции «Новые химико-фармацевтические технологии». – Москва. - Вып. 184. - 2012.- С. 143 - 148.

2. Варламова, Р.М. Аналитические возможности амперометрических биосенсоров в определении некоторых антидепрессантов / Р.М. Варламова, Э.П. Медянцева, **Д.В. Брусницын**, Л.М. Садриева, Г.К. Будников // Материалы VIII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2012». Уфа. - 2012. - С.73.

3. **Брусницын, Д.В.** Амперометрические моноаминоксидазные биосенсоры на основе модифицированных углеродными нанотрубками электродов для определения некоторых антидепрессантов / **Д.В. Брусницын**, Э.П. Медянцева, Л.М. Садриева, Р.М. Варламова, М.А. Байбатарова // XI Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КФУ «Материалы и технологии XXI века». Тезисы докладов. - Казань. - 2012. - С. 20.

4. **Брусницын, Д.В.** Новые амперометрические моноаминоксидазные биосенсоры на основе модифицированных многослойными и однослойными углеродными нанотрубками электродов для определения антидепрессантов / **Д.В. Брусницын** Э.П. Медянцева, Р.М. Варламова, М.А. Байбатарова // «Химия под знаком Сигма: исследования, инновации, технологии»: материалы Всероссийской молодежной конференции. - Казань. - 2012. – С. 99 - 100.

5. **Брусницын, Д.В.** Амперометрические моноаминоксидазные биосенсоры на основе

графитовых печатных электродов модифицированных наноструктурированными материалами как аналитические устройства для определения антидепрессантов / **Д.В. Брусницын**, Р.М. Варламова, М.А. Байбатарова // «Менделеев- 2013». Аналитическая химия. VII Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием по химии и наноматериалам. Тезисы докладов. – СПб. - 2013. – С. 22 - 24.

6. **Брусницын, Д.В.** Амперометрическое определение антидепрессантов моноаминооксидазными биосенсорами на основе графитовых печатных электродов и наноструктурированных материалов / **Д.В. Брусницын**, Э.П. Медянцева, Р.М. Варламова, М.А. Байбатарова, А.Н. Фаттахова, Г.К. Будников // «Второй съезд аналитиков России». Тезисы докладов. – Москва. - 2013. – С. 347.

7. Варламова, Р.М. Амперометрические биосенсоры на основе нанокомпозита: углеродные нанотрубки и наночастицы золота для определения антидепрессантов / Р.М. Варламова, **Д.В. Брусницын**, Э.П. Медянцева, М.А. Байбатарова, А.А. Максимов, Г.К. Будников // Тезисы докладов IX Всероссийская конференция «Химия и медицина» с Молодежной научной школой по органической химии. – Уфа. - 2013. - С. 152.

8. **Брусницын, Д.В.** Амперометрические биосенсоры на основе L-цистеиндесульфгидразы из гомогенатов растительных тканей для определения антидепрессантов / **Д.В. Брусницын**, Э.П. Медянцева, Р.М. Варламова, М.А. Байбатарова, Г.К. Будников // «Второй съезд аналитиков России». Тезисы докладов – Москва. - 2013. – С. 370.

9. **Брусницын, Д.В.** Определение лекарственных препаратов строгого учета амперометрическими моноаминооксидазными биосенсорами / **Д.В. Брусницын**, Э.П. Медянцева, Р.М. Варламова, М.А. Байбатарова, Г.К. Будников, А.Н. Фаттахова, С.С. Бабкина // Сборник материалов конференции «Новые химико-фармацевтические технологии». – Москва. - Вып. 1. – 2014.- С. 28 – 30.

10. **Брусницын, Д.В.** Подходы к повышению чувствительности определения антидепрессантов с использованием амперометрических моноаминооксидазных биосенсоров / **Д.В. Брусницын**, Э.П. Медянцева, Р.М. Варламова, М.А. Байбатарова, Фаттахова А.Н. // «Менделеев – 2014». Химическое материаловедение. Новые аналитические методы в химии. VIII Всероссийская конференция с международным участием молодых учёных по химии. Тезисы докладов. – СПб. - 2014. – С. 268 – 269.

11. **Брусницын, Д.В.** Применение наноструктурированных модификаторов поверхности электродов для разработки амперометрических ферментных сенсоров на основе моноаминоксидазы / **Д.В. Брусницын**, Э.П. Медянцева, Р.М. Варламова, Р.Р. Ситдикова // Сборник Тезисов Всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века».- Казань. - 2014. – С. 176.

12. **Брусницын, Д.В.** Аналитические характеристики амперометрических L – цистеиндесульфгидразных биосенсоров на основе графитовых печатных электродов модифицированных композитом для определения антидепрессантов / **Д.В. Брусницын**, Э.П. Медянцева, Р.М. Варламова, М.А. Байбатарова // «Менделеев – 2014». Химическое

материаловедение. Новые аналитические методы в химии. VIII Всероссийская конференция с международным участием молодых учёных по химии. Тезисы докладов. – СПб. - 2014. – С. 267 – 268.

13. Медянцева, Э.П. Амперометрические биосенсоры на основе тканей растений и грибов для определения некоторых лекарственных соединений и микотоксинов / Э.П. Медянцева, Х. Май Тхи Тхань, **Д.В. Брусницын**, Р.М. Варламова, О.В. Николаева, Г.К. Будников // IV Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием. — Краснодар. - 2014. – С. 279.

14. Sitdikova, R.R. Carbon nanomaterials (reduced graphene oxide, carbon nanotubes) and metal nanoparticles as modifiers of the electrode surface in designing of monoamine oxidase amperometric biosensors / R.R. Sitdikova, E.P. Medyantseva, **D.V. Brusnitsyn**, R.M. Varlamova // «Mendeleev-2015». IX International conference of young scientists on chemistry. Modern techniques in analytical chemistry. Book of abstracts.- Saint Petersburg. - 2015. – P. 423.

15. **Брусницын, Д.В.** Определение антидепрессантов амперометрическими биосенсорами на основе электродов, модифицированных графеном и наночастицами металлов / **Д.В. Брусницын**, Э.П. Медянцева, Р.М. Варламова, А.А. Максимов, Р.Р. Ситдикова, Г.К. Будников// Тезисы докладов X Всероссийской конференции «Химия и медицина» с Молодежной Научной Школой. – Уфа. - 2015. – С. 24.

16. **Брусницын, Д.В.** Применение полиэфирополиола Boltorn H20 в составе амперометрических моноаминоксидазных биосенсоров для определения лекарственных веществ с антидепрессивным действием / **Д.В. Брусницын**, Э.П. Медянцева, Р.М. Варламова, А.Н. Галявина, М.П. Кутырева // Тезисы докладов X Всероссийской конференции «Химия и медицина» с Молодежной Научной Школой. – Уфа. - 2015. – С. 95.

17. Медянцева, Э.П. Селективное определение антидепрессантов моноаминоксидазными биосенсорами на основе углеродных наноматериалов и наночастиц металлов в моче / Э.П. Медянцева, **Д.В. Брусницын**, Р.Р. Ситдикова, Г.К. Будников // Сборник тезисов I Всероссийской конференции с международным участием «Химический анализ и медицина». - Москва. – 2015. – С. 92 – 93.